

Rec'd PCT/PTO 04 NOV 2004

10/500075

PCT/JP02/13491

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

25.12.02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年12月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-400640

[ST.10/C]:

[JP2001-400640]

出 願 人

Applicant(s):

科学技術振興事業団

REC'D 03 MAR 2003

WIPO

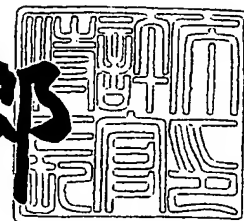
PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3006014

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 KJ-13-013

【提出日】 平成13年12月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12M 1/00

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市南矢三町 3 - 5 - 1 5 タウンハイツ西棟 3
0 7

【氏名】 田 淵 眞 理

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市名東町 1 丁目 1 1 4 - 1 5

【氏名】 馬 場 嘉 信

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細 田 芳 徳

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質の電気泳動法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質を熱変性処理することなくサイズ分離の電気泳動に供することを特徴とする電気泳動法。

【請求項2】 水溶解させたタンパク質を電気泳動に供することを特徴とする請求項1記載の電気泳動法。

【請求項3】 2つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの少なくとも1つを標準濃度と比較して低濃度とすることを特徴とする請求項1または2記載の電気泳動法。

【請求項4】 2つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの1つを被検タンパク質の濃度の $1/10 \sim 10$ 倍の濃度にすることを特徴とする請求項1～3いずれか記載の電気泳動法。

【請求項5】 電気泳動の形態が、キャピラリー電気泳動法、マイクロチップ型電気泳動法およびナノチャンネル型電気泳動法からなる群より選択されたものである請求項1～4いずれか記載の電気泳動法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質の高速、かつ高感度な電気泳動法に関する。

【0002】

【従来の技術】

タンパク質は、一般にはSDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）法に基づき、サイズ分離され、検出される。これをキャピラリー電気泳動に応用したものがSDS-CGE（キャピラリーゲル電気泳動）であり、これをさらにマイクロチップ型電気泳動に応用した方法として、Protein 200キットを用いたAgilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies社製）での解析が挙げられる。タンパク質は、ネイティブな状態では種々の電荷を有しており、正に荷電したタンパク質は正電

場では移動がおこらないことが考えられる。そのため、前記従来法では、通常、全ての被検タンパク質が負電荷を有するように、前処理としてタンパク質の熱変性処理を行う必要がある。熱変性処理は通常、界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液と2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールなどの還元剤中でタンパク質を95～100℃で数分間加熱することにより達成される。2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールはS-S結合の切断のために、また、SDSは全てのタンパク質の電荷を負電荷にするために用いられる。

【0003】

それ故、マイクロチップ型電気泳動により分析工程が高速化されたとしても、SDS-PAGE法やSDS-CGE法などの従来法ではこの前処理工程の時間は短縮されず、操作が煩雑であるという欠点を有している。そのため、より迅速なタンパク質の電気泳動法が望まれている。さらに、生体試料を解析する場合、試料中の極めて微量のタンパク質を解析する必要があり、より高感度な電気泳動法が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、熱変性の前処理工程を行わずにネイティブな状態でタンパク質を迅速に解析することができ、なおかつより高感度な電気泳動法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

即ち、本発明の要旨は、

- 〔1〕 タンパク質を熱変性処理することなくサイズ分離の電気泳動に供することを特徴とする電気泳動法、
- 〔2〕 水溶解させたタンパク質を電気泳動に供することを特徴とする前記〔1〕記載の電気泳動法、
- 〔3〕 2つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの少なくとも1つを標準濃度と比較して低濃度とすることを特徴

とする前記〔1〕または〔2〕記載の電気泳動法、

〔4〕 2つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの1つを被検タンパク質の濃度の1/10～10倍の濃度にすることを特徴とする前記〔1〕～〔3〕いずれか記載の電気泳動法、

〔5〕 電気泳動の形態が、キャピラリー電気泳動法、マイクロチップ型電気泳動法およびナノチャンネル型電気泳動法からなる群より選択されたものである前記〔1〕～〔4〕いずれか記載の電気泳動法、

に関する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明のタンパク質の電気泳動法は、タンパク質を熱変性処理することなくサイズ分離を目的とした電気泳動に供することを1つの大きな特徴とする。本発明の電気泳動法は、熱変性処理を行わないことにより、電気泳動の分析時間を短縮化することができ、操作を簡便化することができるという利点を有する。

【0007】

本明細書において、タンパク質とは、複数のアミノ酸がペプチド結合により連結された化合物をいい、天然由来物、合成物、および短鎖のペプチドをも含むことを意味する。

【0008】

本発明の電気泳動法において解析されうるタンパク質としては、特に限定されることなく、天然由来物、合成物およびアミノ酸以外の構成成分を含む核タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質等を解析することができるが水溶性タンパク質に特に好適に使用される。測定可能な分子サイズは、マーカーを適宜設定することによりあらゆるサイズのタンパク質が解析可能となるが、特に6kDa～210kDaのタンパク質が好適に解析されうる。なお、膜結合したタンパク質等は可溶化後に本発明の電気泳動法に適用されるのが好ましい。そのための可溶化処理は塩溶液やEDTAなどのキレート剤で超音波等の機械的処理、または界面活性剤での処理等により達成される。

【0009】

本発明の電気泳動法に使用する分離用担体としては、特に限定されるものではなく、通常のキャピラリーゲル電気泳動またはマイクロチップ型ゲル電気泳動等においてタンパク質の分子サイズ分離分析用として使用される、ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミドゲル、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、 β -シクロデキストリン、 α -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン等の分離用担体が挙げられ、また、PCT/JPO1/04510記載の β -1, 3グルカン構造を含むカードラン、ラミナランや海藻抽出物等にも適用可能である。分離用担体の添加剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、Triton X-100、 ϵ -アミノカプロン酸、3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアミノ]-1-プロパン、CHAPS、6~8M尿素、テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、ヘキシルトリメチルアンモニウムブロマイド (HTAB)、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (DTAB) 等が挙げられる。

【0010】

泳動用緩衝液としては、例えば、トリス-グリシンバッファー、トリス-ホウ酸バッファー、トリス-塩酸バッファー、トリス-トリシンバッファー、トリス-リン酸二水素ナトリウムバッファー等や、一般にタンパク質の電気泳動用緩衝液として使用される緩衝液が挙げられ、市販のタンパク質電気泳動用キット中に提供されている緩衝液等も使用することができる。前記泳動用緩衝液は、一般にタンパク質の電気泳動用緩衝液として使用される濃度で使用するすることができる。

【0011】

泳動用緩衝液は、前記分離用担体を含有していてもよい。分離用担体を泳動用緩衝液に添加して用いることにより、操作を簡便にすることができ、解析をより高速で行うことができる。

【0012】

泳動用緩衝液のpHは、適切な電気浸透流およびタンパク質の好適な電気泳動の観点から、2.0~9.0が好ましく、6.8~8.6がより好ましい。

【0013】

試料調製用溶液としては、水、S D S 溶液、またはS D S - トリスホウ酸溶液等に2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールを添加したもの等を使用することができる。ピーク強度の向上、ピーク分離度の向上、検出限界の向上、測定精度の向上の観点から、水が特に好ましい。

【 0 0 1 4 】

水としては、超純水、脱イオン水、M i l l i Q 水等、タンパク質の電気泳動に通常使用される水が使用されうるが、M i l l i Q 水が特に好ましい。

【 0 0 1 5 】

また、水を試料調製用溶液として使用する場合、ピーク強度の増強、検出限界の向上の観点から、タンパク質を水溶解させることが好ましい。

【 0 0 1 6 】

試料溶液中のタンパク質の濃度としては、測定精度の観点から、0.05~2000 ng / μ l が好ましく、0.1~2000 ng / μ l がより好ましく、0.5~200 ng / μ l が特に好ましい。

【 0 0 1 7 】

本発明の電気泳動法が使用されうる好ましい形態としては、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ型電気泳動、およびナノチャンネル型電気泳動が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

キャピラリー電気泳動は、通常、内径が100 μ m 以下のキャピラリー内に泳動用緩衝液を充填し、一端側に試料を導入した後、両端間に高電圧を印加して被検タンパク質をキャピラリー内で展開させるものである。キャピラリーとしては、フューヌドシリカキャピラリーが通常用いられ、その内壁がコーティングされていないもの、内壁がコーティングされているもの（50%フェニルメチルポリシロキサン、ポリエチレングリコール、ポリアミン等）が用いられる。また、コーティングなしのものにP E O（ポリエチレンオキサイド）等で処理したものも用いられる。

【 0 0 1 9 】

キャピラリー電気泳動の形態では、本発明の電気泳動法は、具体的には、タン

パク質を含む試料を熱変性させることなく、試料をキャピラリーにインジェクトし、タンパク質の分離が可能な泳動電場下にタンパク質を移動させる工程、および泳動電場によりタンパク質を泳動させる工程を含むプロセスにより行なわれる。

【0020】

試料をキャピラリーにインジェクトし、タンパク質の分離が可能な泳動電場下にタンパク質を移動させる工程は、より具体的には、電圧法、加圧法、落差法により行われるが、装置の種類や、キャピラリーの太さ（内径）や長さ等により、電圧や加える圧力の大きさおよびそれらに供する時間が適宜決められる。さらに、PCT/JP01/04510記載の方法も適用可能である。

【0021】

キャピラリー電気泳動に使用されるキャピラリーにおいて、内径、外径、全長、有効長は、特に限定されるものではなく、通常使用されるサイズのものが使用されうる。有効長に関して、高速での解析を可能にする観点から、短い有効長のキャピラリーを用いることができる。ここで、キャピラリーの有効長とは、試料注入口から検出部までの距離をいう。

【0022】

キャピラリー電気泳動における泳動電場は、良好な分離能を得、移動時間を短縮する観点から、好ましくは、 $20\text{ V/cm} \sim 10\text{ kV/cm}$ であり、より好ましくは、 $50\text{ V/cm} \sim 5\text{ kV/cm}$ であり、特に好ましくは $100\text{ V/cm} \sim 1\text{ kV/cm}$ であることが望ましい。

【0023】

マイクロチップ型電気泳動においては、ローディングチャンネルと、該ローディングチャンネルに交差する分離用チャンネルとを備え、かつ該ローディングチャンネルの一端に試料リザーバーが配置され、該ローディングチャンネルの他端にアウトレットが配置されたマイクロチップが用いられる。

【0024】

マイクロチップ型電気泳動の形態では、本発明の電気泳動法は、具体的には、タンパク質を含む試料を熱変性させることなく、試料リザーバーに試料を供する

工程、該試料リザーバー中の試料を分離用チャンネルに導入する工程、および分離用チャンネルにおいて試料を泳動させる工程を含むプロセスにより行なわれる。

【0025】

試料リザーバーに試料を供する工程は、より具体的には、ローディングチャンネルの一端の試料リザーバーと他端のアウトレットに電圧をかけることにより達成される。電圧の強さは装置により異なるが、SV1100（日立電子社製）の場合、50～800V、通常300Vの電圧がかけられる。これにより試料がローディングチャンネルと分離用チャンネルの交差部に供される。一方、PCT/JPO1/04510記載の方法も適用可能である。

【0026】

試料リザーバー中の試料を分離用チャンネルに導入する工程は、より具体的には、ローディングチャンネルの一端の試料リザーバーとその他端のアウトレットにスクイー징電圧をかけ、余分な試料を試料リザーバーとその他端のアウトレット側に排出する工程および分離用チャンネルのアウトレット側と、その反対側に分離電圧をかける工程が同時に達成される。電圧の強さは装置により適宜選択されるが、SV1100（日立電子社製）の場合、前者は130V前後、後者は700～900Vで達成される。一方、PCT/JPO1/04510記載の方法も適用可能である。

【0027】

マイクロチップの材質としては、例えば、石英ガラス、ホウケイ酸ガラス、ソーダガラス、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ジメチルシロキサンなどが挙げられる。なかでも、試料の吸着が少なく、チップ加工が容易である観点から、ガラス、またはポリメチルメタクリレートが望ましい。また、キャピラリーと同様に内壁を加工処理したものも用いられる。

【0028】

マイクロチップ型電気泳動においては、マイクロチップの大きさは、例えば、縦10～120mm、横10～120mm、厚さ500～5000μmである。

【0029】

マイクロチップにおけるローディングチャンネルおよび分離用チャンネルのそれぞ

れの形状は特に限定されるものではない。なお、前記チャンネルが一枚のチップ上に3～96本設置された、同時に多チャンネルを解析することができるチップを使用することもできる。多チャンネルの並べ方は、並行、放射線状、円形状等があるが、その形状は特に限定されるものではない。

【0030】

前記チャンネルの幅は、マイクロチップの大きさ、使用目的などにより適宜設定されうる。具体的には、チャンネルの幅は、十分な解析感度を得る観点から、0.1 μm 以上、好ましくは10 μm 以上であり、十分な解析精度を得る観点から、100 μm 以下、好ましくは50 μm 以下であることが望ましい。また、前記チャンネルの深さは、マイクロチップの大きさ、使用目的などにより適宜設定されうる。具体的には、十分な解析感度を得る観点から、0.1 μm 以上、好ましくは10 μm 以上であり、十分な解析精度を得る観点から、100 μm 以下、好ましくは50 μm 以下であることが望ましい。さらに、前記分離用チャンネルの長さは、マイクロチップの大きさ、解析対象の化合物に応じて適宜選択することができるが、有効長を、より長くすることが望ましい。有効長は、チャンネル交差部から、高分子化合物の検出点（分離用チャンネル上に配置）までの距離をいう。十分な分離能を得る観点から、0.1 mm以上、好ましくは10 mm以上であり、高速分離の観点から、100 mm以下、好ましくは50 mm以下であることが望ましい。

【0031】

また、前記リザーバーの大きさは、試料の容量に応じて適宜設定することができる。具体的には、試料導入のハンドリングおよび電極の太さの観点から、直径0.05 mm以上、好ましくは3 mm以下であることが望ましい。

【0032】

マイクロチップ型電気泳動における泳動電場は、良好な分離能を得、移動時間を短縮する観点から、20 V/cm～50 kV/cmであり、好ましくは、50 V/cm～20 kV/cmであり、より好ましくは100 V/cm～10 kV/cmであることが望ましい。

【0033】

ナノチャンネル型電気泳動とは、ナノメートルサイズ、 $1\text{ nm}\sim 1\text{ }\mu\text{ m}$ 、好ましくは $10\sim 500\text{ nm}$ 、より好ましくは $50\sim 100\text{ nm}$ のチャンネル幅からなる流路が形成されたチップを用いて行なわれる電気泳動をいう。これには上記記載のナノサイズの構造体がマイクロメートルサイズのチャンネルに形成されているものを含む。ナノサイズの構造体の形状は、特に限定されることなく、例えば、四角、丸、三角等のものが使用され得、構造体の設置間隔も特に限定されない。これらが形成されたナノチャンネルチップが用いられる。キャピラリー電気泳動の場合と同様に同時に多チャンネル解析可能なチップも含まれる。

【 0 0 3 4 】

ナノチャンネル型電気泳動におけるチャンネルは、サイズがナノメートルという特徴をもつチャンネルの形状が曲率を曲げたもの、蛇行状、ジグザグ状またはそれらの組み合わせ等、様々な設計が可能である。このことにより、微小スケール内に多くのチャンネルを形成できる。また、このことにより一度に多数のサンプルを処理することができ、ハイスループット化が可能である。またナノサイズの構造体がマイクロメートルサイズのチャンネルに形成される場合、その形状を自在に変えることができ、その設置間隔も自在に変えられるという利点をもつ。同時に多チャンネルの測定が可能である。

【 0 0 3 5 】

ナノチャンネル型電気泳動においてもマイクロチップ型電気泳動と同様にローディングチャンネル、該ローディングチャンネルに交差する分離用チャンネル、該ローディングチャンネルの一端に試料リザーバー、該ローディングチャンネルの他端にアウトレットが配置されたものを含むが、形状は特に限定されるものではない。

【 0 0 3 6 】

ナノチャンネル型電気泳動に用いられるナノチャンネルチップの材質としては、マイクロチップと同様のものが用いられる。例えば、石英ガラス、ホウケイ酸ガラス、ソーダガラス、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ジメチルシロキサンなどが挙げられる。

【 0 0 3 7 】

ナノチャンネル型電気泳動におけるナノチャンネルチップの大きさはマイクロチッ

ブと同様のものが適用される。例えば縦10～120mm、横10～120mm、厚さ500～5000 μ mである。ナノチャネルチップのチャネルの深さ、チャネルの長さ、リザーバーの大きさ等はマイクロチップに準ずる。

【0038】

本発明のタンパク質の電気泳動法においては、分子量マーカーをタンパク質試料と共に電気泳動に供することができる。分子量マーカーとしては、Agilent Technologies No. 5065-4430の分子サイズ6kDa、分子サイズ210kDaのMyosin、HMW、LMWマーカーキット（Amersham Pharmacia Biotech社）等のタンパク質の電気泳動に通常使用される市販の分子量マーカーや、市販の分子量および濃度既知の標準試料のタンパク質や生体試料から精製および／または定量したタンパク質を含む分子量マーカーを用いることができる。これらの分子量マーカーは組み合わせて使用することもできる。

【0039】

本発明のタンパク質の電気泳動法では、分子量マーカーとして、被検タンパク質に対して測定可能な範囲内で低分子量側および高分子量側になるような2つの分子量マーカーを用いることもできる。これにより、より良好な移動時間の調整と定量が達成されうる。本明細書中では、低分子量側の分子量マーカーを「Lowerマーカー」とよび、高分子量側の分子量マーカーを「Upperマーカー」とよぶ。

【0040】

Lowerマーカーとしては、例えば、分子サイズ6kDaのAgilent Technologies No. 5065-4430が挙げられる。Upperマーカーとしては、例えば、分子サイズ210kDaのMyosinが挙げられる。

【0041】

本発明のタンパク質の電気泳動法では、LowerマーカーおよびUpperマーカーに他の分子量マーカーを組み合わせて使用することもできる。

【0042】

分子量マーカーの使用量としては、タンパク質の電気泳動で一般に使用される量で使用されうる。装置の種類、その装置における検出限界、検出感度、測定精度等に応じて製造業者または一般的なプロトコルにより推奨される試料溶液中の分子量マーカーの濃度を本明細書中ではタンパク質の電気泳動に通常使用される濃度として、「標準濃度」とよぶ。例えば、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) においては、被検濃度、検出感度、測定精度の観点から、試料溶液中 74 ng/ml 前後が特に好ましく、この濃度が標準濃度となる。

【 0 0 4 3 】

本発明のタンパク質の電気泳動法では、2以上の分子量マーカーを使用する場合、少なくとも1つの分子量マーカーを標準濃度と比べて低濃度、好ましくは標準濃度の $1/30 \sim 1/2$ 、より好ましくは $1/15 \sim 1/3$ 、特に好ましくは $1/10 \sim 2/7$ の濃度でを使用することにより、分析対象のタンパク質の検出感度を向上することができる。これは、低濃度領域の目盛りを拡大することにより、検出感度が検出精度を上回るためである。さらに希釈マーカーを用いることにより既製マーカー溶液中のイオンを希釈することができる。一方、泳動中のイオン強度が低いほど感度は高いため、最終的に感度を上昇させることができる。

【 0 0 4 4 】

前記態様において、Lowerマーカーおよび/またはUpperマーカー標準濃度と比べて低濃度にして使用することもできる。Lowerマーカーを標準濃度と比べて低濃度で使用する場合には、好ましくは標準濃度の $1/30 \sim 1/2$ の濃度、より好ましくは $1/15 \sim 1/3$ の濃度、特に好ましくは $1/10 \sim 2/7$ の濃度で、一方、Upperマーカーを標準濃度と比べて低濃度で使用する場合には、好ましくは標準濃度の $1/20 \sim 2/3$ の濃度、より好ましくは $1/15 \sim 1/3$ の濃度、特に好ましくは $1/10 \sim 2/7$ の濃度でを使用することにより、分析対象のタンパク質の検出感度を向上することができる。また、Lowerマーカーおよび/またはUpperマーカーをそれぞれの標準濃度よりも低濃度で使用し、さらに他のマーカーを組み合わせることもできる。

【 0 0 4 5 】

また、本発明のタンパク質の電気泳動法では、2以上のマーカを使用する場合、その内の1つを、測定試料における被検タンパク質の濃度と実質的に同等もしくは近似した濃度にするにより、被検タンパク質の検出感度を向上することができる。これは、被検タンパク質と実質的に同等もしくは近似した濃度に分子量マーカの濃度が設定されること、およびマーカの目盛に近い位置で測定が行なわれることにより、精度よく測定することができるためである。被検タンパク質の濃度と実質的に同等もしくは近似した濃度とは、具体的には、測定試料における被検タンパク質の濃度の、好ましくは $1/10 \sim 10$ 倍、より好ましくは $1/5 \sim 5$ 倍、特に好ましくは $1/2 \sim 2$ 倍である。

【0046】

前記態様において、LowerマーカまたはUpperマーカをさらに組み合わせて使用することもできる。また、LowerマーカまたはUpperマーカを被検タンパク質の濃度と同等もしくは近似した濃度にして使用することもできる。また、被検タンパク質と同等もしくは近似した濃度でLowerマーカまたはUpperマーカを使用し、さらに他の分子量マーカを組み合わせて使用することもできる。

【0047】

電気泳動に供したタンパク質の検出法としては、例えば、UV波長光による吸収、蛍光、レーザー、ランプ、LEDなどによる検出、電気化学的検出、化学発光検出などが挙げられる。具体的には、タンパク質またはペプチドの場合、200nmにおける吸収を測定すること；SYPRO Orangeとタンパク質またはペプチドとを反応させ、460～550nmで励起させ、550～650nmで蛍光を測定すること、あるいはタンパク質と蛍光マーカ（Agilent Technologies No. 5065-4430）と反応させ、630～650nmで励起させ、670～700nmで蛍光を測定すること、および電気化学的測定、化学発光測定などにより、タンパク質またはペプチドを検出することができる。

【0048】

キャピラリー電気泳動においては、例えば、キャピラリーのアウトレットに、

UV波長光を発しうる装置と該UV波長光の検出器とを設置してもよく、あるいは蛍光波長を発しうる装置と該蛍光波長を検出可能な検出器とを設置してもよい。

【0049】

マイクロチップ型電気泳動においては、例えば、分離用チャンネル上に配置された検出点にUV波長光の検出器を設置してもよく、あるいは、蛍光波長を発しうる装置と該蛍光波長を検出可能な検出器とを設置してもよい。また同時に多チャンネルを検出可能である。

【0050】

ナノチャンネル型電気泳動においては、マイクロチップ型電気泳動の場合と同じ検出器、検出方法が適用される。さらにナノチャンネル型電気泳動においては、同時多チャンネル検出の際、マイクロチップ型電気泳動の場合よりも多数のサンプルを同時に検出可能である。

【0051】

検出の際、タンパク質、ペプチド、アミノ酸などの同定を行う場合には、UV吸収、分子量マーカー、標品との移動時間の比較、マススペクトルの解析などにより行うことができる。

【0052】

【実施例】

実施例中、タンパク質の電気泳動は全てAgilent Technologies社のマイクロチップ型電気泳動装置Agilent 2100 Bioanalyzerおよび同社のProtein 200 Kitを用いて行なった。従来法は、Agilent Technologies推奨のプロトコールにより行なった。具体的には以下の1～7の工程を含む。

1. 3 μ lのUpperマーカーに90 μ lの変成処理用緩衝液と3 μ lの100 mMのジチオスレイトールを加え、ボルテックスにより5秒間混合する。
2. Lowerマーカー15 μ lの原液をとり、1.0 mlのmilliQ水と混合する。
3. 3 μ lのラダー液およびそれと別に上記1. で作成した変成処理用緩衝液の

混合物 2 μ l と 4 μ l の被検タンパク質サンプルを入れてボルテックスで混合し、1000 \times g で 5 秒間遠心する。

4. 上記 3 のサンプルを 100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱する。

5. 加熱終了後 1 ～ 2 分間放冷する。

6. 加熱・放冷処理後のラダー液および被検タンパク質液に上記 2. で調製した Lower マーカー液を 84 μ l ずつ加えて混合する。

7. 上記 6 の調製物を各 6 μ l ずつ被検サンプルとして電気泳動に供する。

【0053】

なお、本発明のタンパク質の電気泳動法では、従来法との比較のために、上記 Agilent Technologies 推奨のプロトコルを基にして、各実施例に記載の変更点を加えてタンパク質の電気泳動を行った。

【0054】

Lower マーカーとして、分子サイズ 6 kDa の Agilent Technologies No. 5065-4430 を使用し、Upper マーカーとして、分子サイズ 210 kDa のミオシンを使用した。

【0055】

なお、ラダー液とは、分子サイズの決定を行なうための分子量既知の標準サンプルであり、以下のものが各々 74 ng/ml で含まれる：

リゾチーム (14.3 kDa)、 β -ラクトグロブリン (18.4 kDa)、carbonic anhydrase (29.0 kDa)、オボアルブミン (43.0 kDa)、血清アルブミン (68.0 kDa)、ホスホリラーゼ B (97.4 kDa)、ミオシン (210 kDa)。

【0056】

実施例 1

図 1 A ～ D は、従来法におけるタンパク質の前処理（熱変性処理）を行なった後にマイクロチップ型電気泳動を行なった場合のエレクトロフェログラムであり、図 1 E ～ M は熱変性処理を行なわない場合である。タンパク質として 1 μ g / μ l のウシ血清アルブミン (BSA) (SIGMA) を用いた。

【0057】

移動時間 2 0 s 前後の 2 本のピークは Lower マーカー由来のもの、4 0 s 付近の 1 本のピークは Upper マーカー由来のものである。BSA のピークは 2 5 s ~ 3 0 s のものである。

【0 0 5 8】

従来法：通常の方法（Agilent Technologies 推奨の方法）による結果を図 1 A に示す。これに対し、図 1 B は熱変性処理の際、ジチオスレイトールを添加しないものである。また図 1 C は熱変性処理の際、サンプルバッファー（Agilent Technologies のキット内のもの、SDS 含有の緩衝液と考えられる）の代わりに SDS なしの脱イオン水（ICN Biomedicals, Inc. 社製）を用いたものであり、図 1 D は、脱イオン水を用い、ジチオスレイトールを添加しない系である。

【0 0 5 9】

その結果、脱イオン水を用いることにより、強度低下が認められた。これに対し、熱変性処理なしの場合で規定のサンプルバッファーとジチオスレイトールを添加したものは、強度が図 1 より向上した（図 1 E）。これはジチオスレイトールに因らなかった（図 1 F）。

【0 0 6 0】

一方、熱変性処理なしでサンプルバッファーの代わりに脱イオン水にタンパク質を溶解させ、ジチオスレイトールを添加したものは劇的な強度増加を示した（図 1 G）。これはジチオスレイトールなしでも同様であった（図 1 H）。これらは、Upper マーカーを 2 倍濃度にして用いた場合も、全く同様であった（図 1 L）。また、熱変性処理なしで脱イオン水を用いた系の強度の再現性は良好であった（図 1 M）。

【0 0 6 1】

これらの結果より、熱変性処理を行わず、タンパク質をバッファーではなく水溶解した場合、スペクトル強度を 8 ~ 1 0 倍向上することができた。

【0 0 6 2】

実施例 2

図 2 はスペクトル強度の濃度変化を熱変性処理あり（従来法）となし（実施

例1E記載)で比較したものである。図2A~Jは熱変性処理ありのもの、図2K~Sは熱変性処理なしで、実施例1記載の水を用い、ジチオスレイトールなしのものである。被検タンパク質であるBSAの濃度は、図2A、K: $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B, L: $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C, M: $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D, N: $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, E: $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, F, O: $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, G, P: $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, H, Q: $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, I, R: $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, J, S: $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

【0063】

これらの結果より、従来法(反応あり)の系では検出限界が $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ であるのに対し、本発明の方法(反応なし)は $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ あり、10倍の感度上昇が認められた。

【0064】

実施例3

図3は実施例2のスペクトル強度の濃度変化を熱変性処理あり(従来法)の再現性を調べたものである。被検タンパク質であるBSAの濃度は、図3A~A' ' 'は $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B~B' ' ' : $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C~C' ' ' : $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D~D' ' ' : $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, E~E' ' ' : $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, F~F' ' ' : $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, G~G' ' ' : $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, H~H' ' ' : $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, I~I' ' ' : $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, J~J' ' ' : $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

【0065】

これらの結果より、従来法(反応あり)の系の再現性は高く、検出限界が $0.05 \sim 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ であることがわかった。

【0066】

実施例4

図4は実施例2のスペクトル強度の濃度変化を熱変性処理なし(実施例1E記載の水を用い、ジチオスレイトールなしのもの)の再現性を調べたものである。図4A~A' ' 'はBSA $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B~B' ' ' : $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C~C' ' ' : $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D~D' ' ' : $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, F~F' ' ' : $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, G~G' ' ' : $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, H~H' ' ' : $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, I~I' ' ' : $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, J~J' ' ' : $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, G \sim G' ' ' : 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, H \sim H' ' ' : 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, I, I', I' ' : 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, J \sim J' ' ' : 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

【0067】

これらの結果より、熱変性処理なしの系では再現性が高く、検出限界が0.01 \sim 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であることがわかった。

【0068】

実施例5

図5は低濃度での検出を示す。図5A-Cは、実施例1記載の本発明の方法の水を用い、ジチオスレイトールなしのものにさらに、Lowerマーカ-またはUpperマーカ-のいずれか一方のマーカ-を標準濃度と比べて低濃度で用いた方法である。図5Aは0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSAで通常のLowerマーカ-濃度B: 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSAでLowerマーカ-濃度を従来の1/2で用いたもの、C: 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSAで、Lowerマーカ-濃度1/2にさらにUpperマーカ-濃度を従来の1/10で用いたものである。

【0069】

図5D-Jは、Lowerマーカ-が規定の1/4に対し、被検タンパク質と同濃度のインシュリン（ウシ膵臓由来, SIGMA）をLowerマーカ-としてさらに加えたものである。D: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, E: 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, F: 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, G: 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, H: 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, I: 0.0005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, J: 0.0001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。この方法により、BSAの検出限界が0.0005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ まで可能となった。

【0070】

実施例6

他のタンパク質についての検出限界を実施例5と同様に調べた。図6A-Jは従来法（熱変性処理あり）によるミオグロビン（ウマ骨格筋由来, SIGMA）である。図6B'、E'、H'、I'は同様の再現性をみたものである。図6K-Oは従来法によるトリプシン（I型、ウシ膵臓由来, SIGMA）である。そ

それぞれの濃度はA, K: $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B, B': $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C: $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D, L: $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, E, E': $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, F: $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, M: $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, H, H', N: $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, I, I', O: $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, J: $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。この方法により、ミオグロビン、トリプシンの検出限界はいずれも $0.05 \sim 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。これは、BSAの場合と一致した。

【0071】

実施例7

ミオグロビンおよびBSAについて、熱変性処理ありの系における従来法と、Lowerマーカーとして、被検タンパク質と実質的に同等もしくは近似した量のマーカー（ここでは便宜上、可変濃度マーカーとよぶ）を用いたものとの比較を行なった。

【0072】

図7A～Iは従来法（熱変性処理あり）によるミオグロビンである。図7A'～I'は熱変性処理ありであるが可変濃度マーカーを用いている。図7J～Rは従来法（熱変性処理あり）によるBSAである。図7J'～R'は熱変性処理ありであるが可変濃度マーカーを用いている。それぞれ、可変濃度マーカーとしてインスリンを用いた。それぞれの可変マーカーの濃度はA, A', J, J': $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B, B, K: $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C, C', L, L': $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D, D', M, M': $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, E, E', N: $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, F, F', O, O': $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, G, G', P, P': $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, H, H', Q, Q': $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, I, I', R': $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

【0073】

従来法でミオグロビン、BSAは検出限界 $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ であるのに対し、可変濃度マーカーを用いた場合には $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となったが、反応なしの実施例6の系と比べて劇的な向上ではなかった。しかしながら、反応ありの場合でも可変濃度マーカーの効果があることがわかった。

【0074】

【発明の効果】

本発明によれば、熱変性の前処理工程を行わずにネイティブな状態でタンパク質を迅速に解析することができ、なおかつより高感度な電気泳動法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

【図 2】

図 2 は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

【図 3】

図 3 は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

【図 4】

図 2 は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

【図 5】

図 5 は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

【図 6】

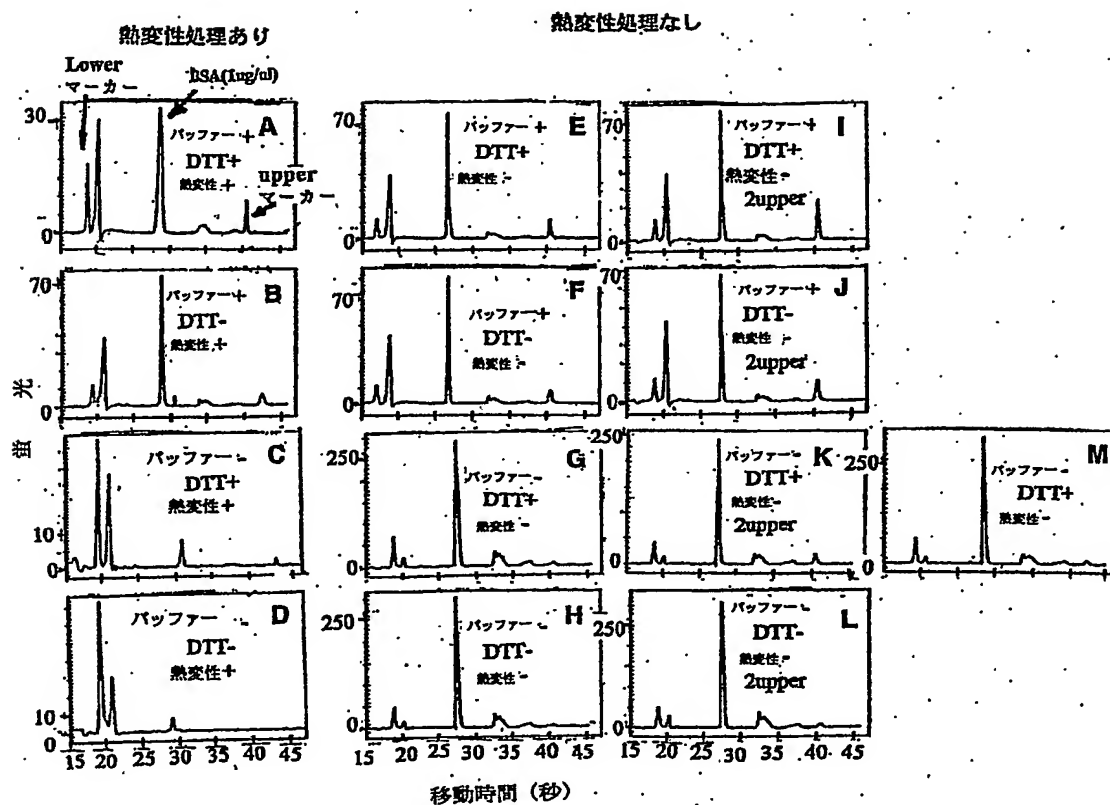
図 6 は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

【図 7】

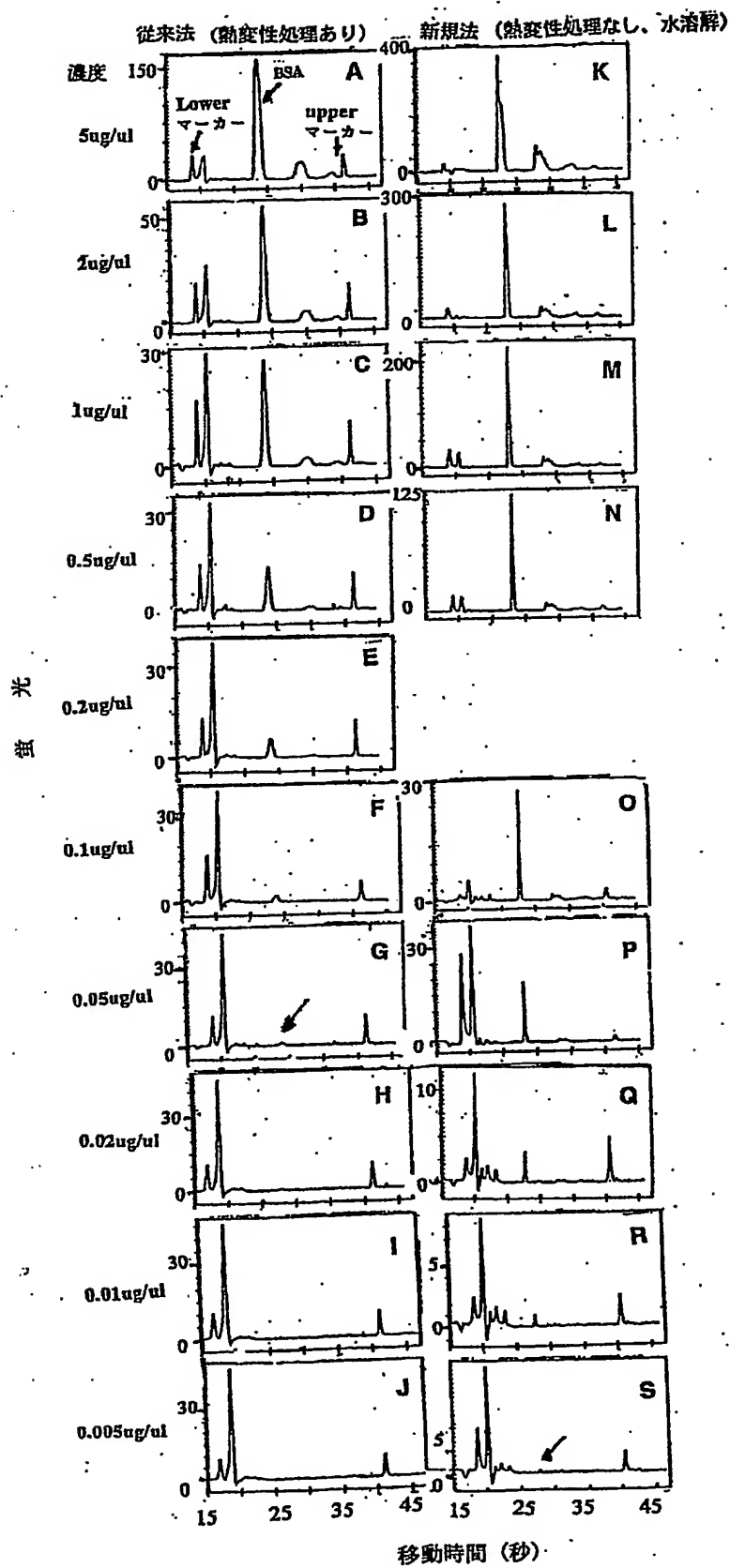
図 7 は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

【書類名】 図面

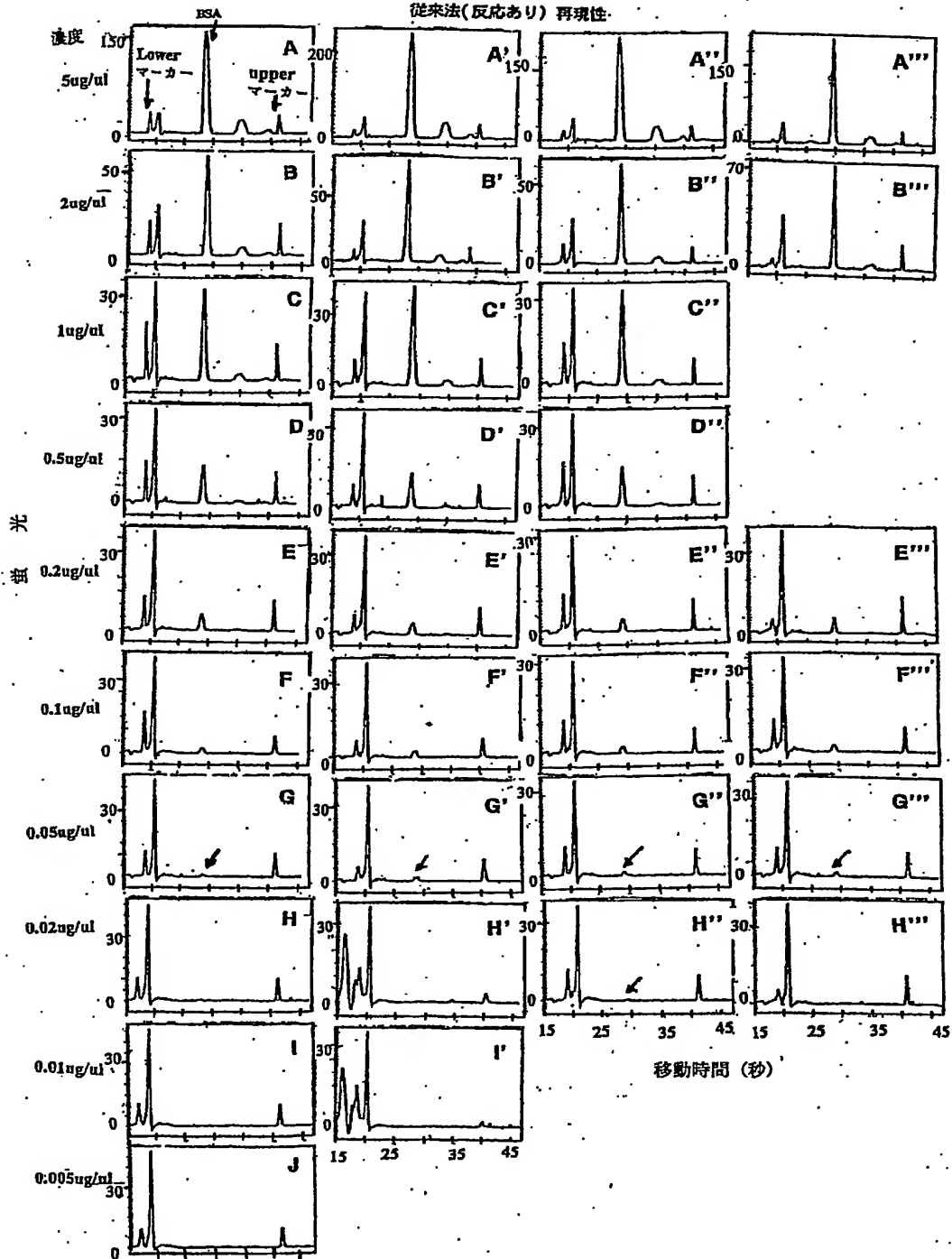
【図 1】



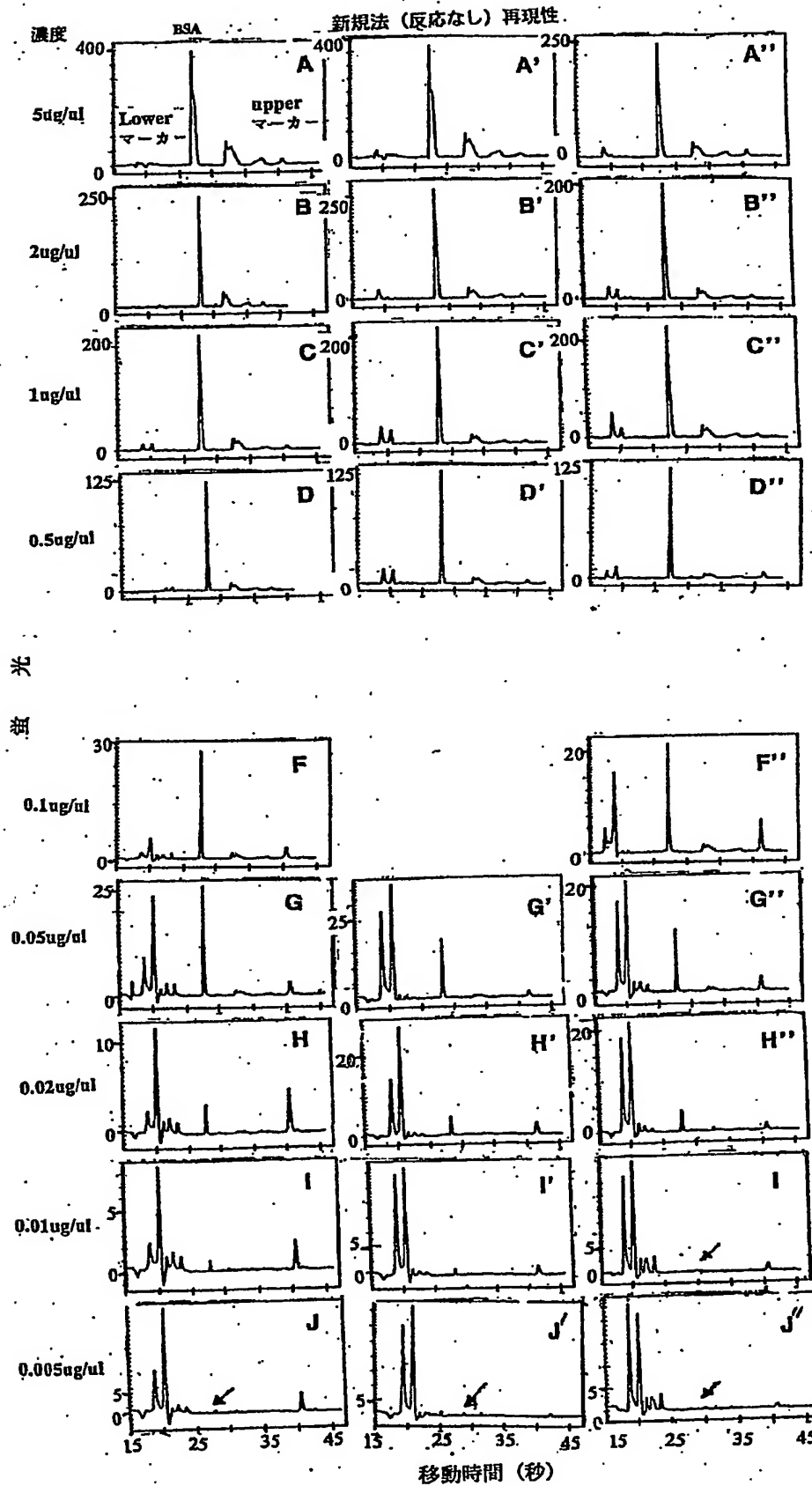
【圖 2】



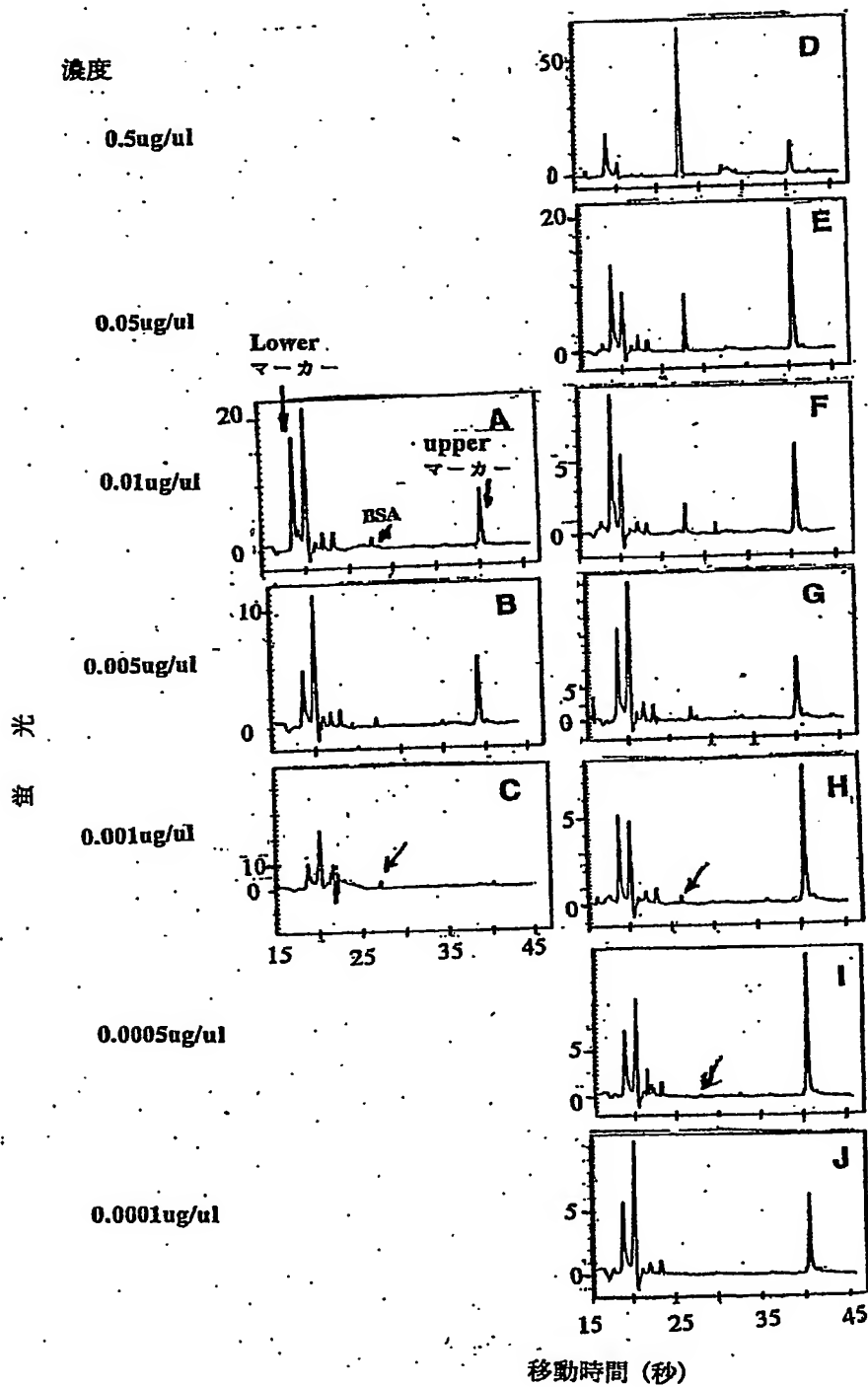
【図 3】



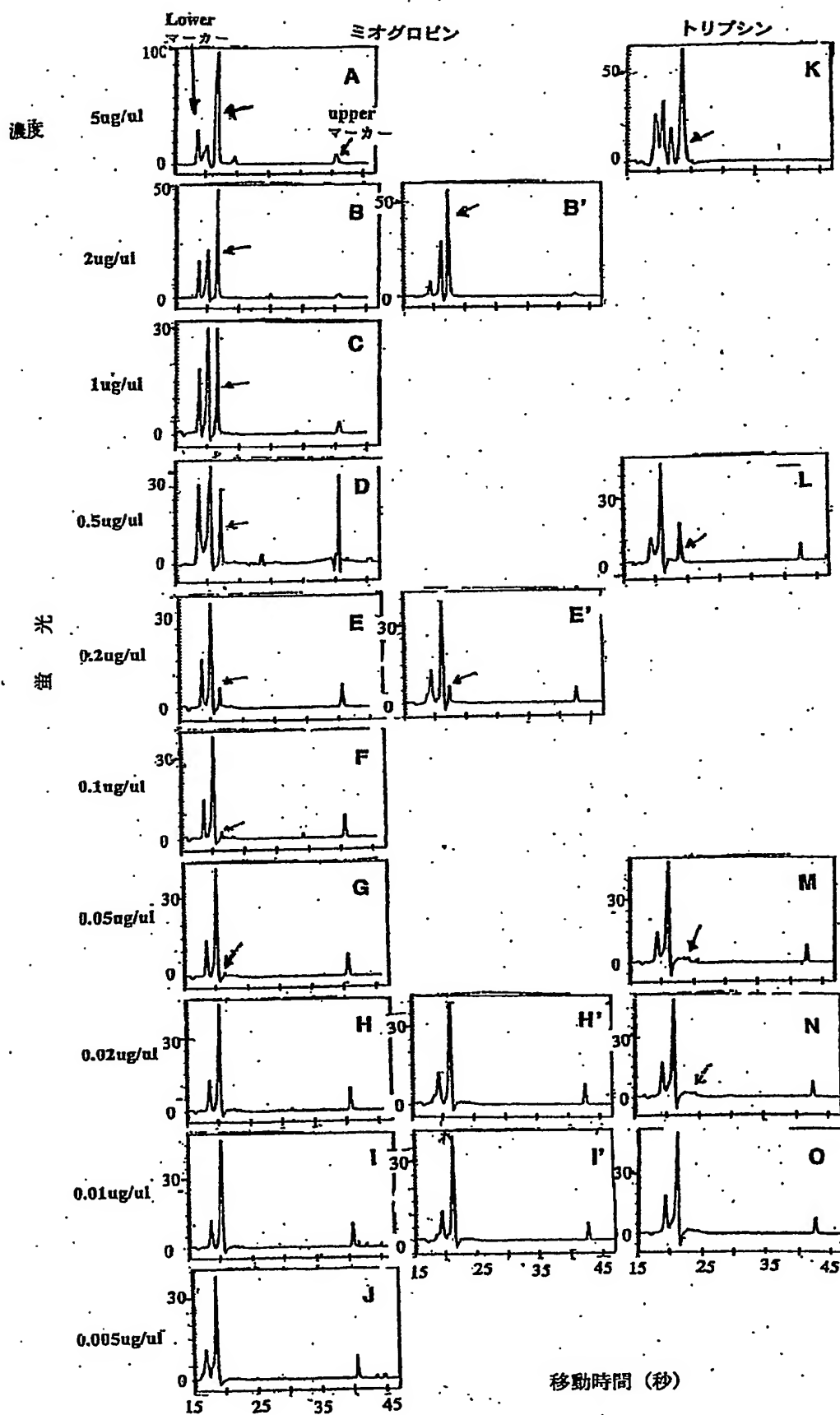
【图 4】



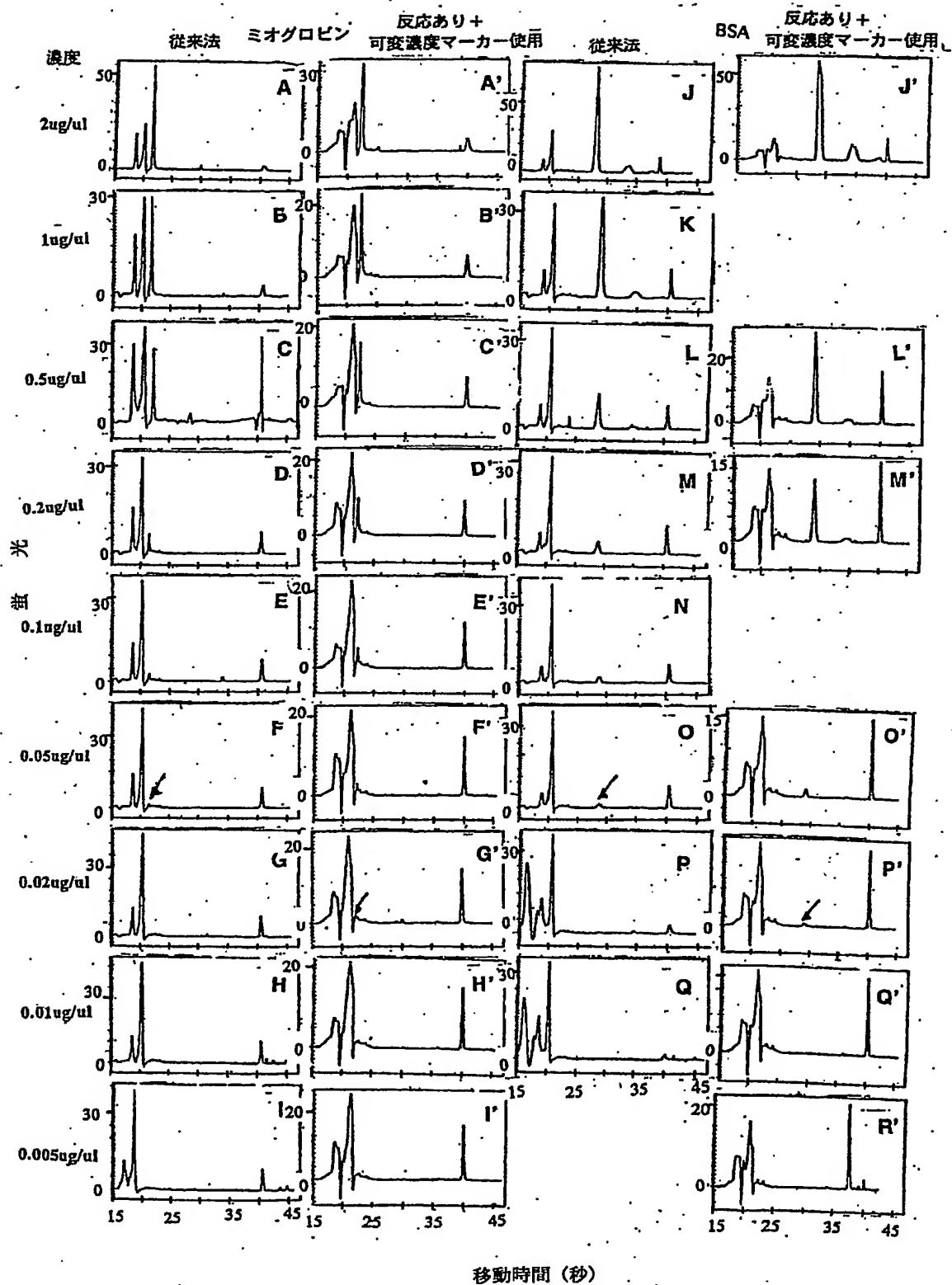
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、熱変性の前処理工程を行わずにネイティブな状態でタンパク質を迅速に解析することができ、なおかつより高感度な電気泳動法を提供すること。

【解決手段】

タンパク質を熱変性処理することなくサイズ分離の電気泳動に供することを特徴とする電気泳動法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.